

機関番号：32607

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500291

研究課題名 (和文) グリア細胞が分泌する脳神経栄養因子の作用機序の解明

研究課題名 (英文) Analysis of exocytotic mechanism of BDNF from astrocytes.

研究代表者

板倉 誠 (ITAKURA MAKOTO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30398581

研究成果の概要 (和文)：脳は神経細胞やグリア細胞を含むさまざまな細胞で構成されている。グリア細胞の一種であるアストログリア細胞は、さまざまな生理活性物質をカルシウムや SNARE タンパク質依存的に開口放出していることが知られている。本研究で我々は、培養アストログリア細胞をプロテインキナーゼ C の活性化剤 PMA で処理すると強制発現した成長ホルモンの開口放出が抑制されることを見出した。さらに培養アストログリア細胞では SNARE タンパク質 SNAP-23 の 95,120,160 番目のセリン残基が PMA 依存的にリン酸化されることも明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The brain are made up of many cells, including neurons and glial cells. Astrocytes, a type of glial cells release various bioactive substances via Ca(2+) - and SNARE-dependent exocytosis. In the present study, we revealed that potent protein kinase C activator, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment suppressed exogenously expressed human growth hormone release from cultured astrocytes. Moreover, PMA treatment induced the phosphorylation of synaptosomal-associated protein of 23 kDa on Ser(95), Ser(120), and Ser(160).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：グリア細胞, 開口放出, 脳神経栄養因子, プロテインキナーゼ C, SNAP-23

1. 研究開始当初の背景

脳神経栄養因子 (BDNF) 含む神経成長因子は、神経細胞の生存や分化の制御を行っている。また BDNF は中枢神経のシナプス可塑性を制御することで記憶や学習といった脳の高次機能にも関与していることが近年報告されている。さらに脳疾患において BDNF の発現量が大きく変動すること、および BDNF

に関連するさまざまな遺伝子改変動物がいろいろな行動異常を起こすことから、BDNF はてんかんや統合失調症といった神経精神疾患の病因に深く関与していることが予想されている。そのため、BDNF の生理作用およびその作用機序の詳細な分子機構を明らかにすることが求められている。

BDNF は神経活動やさまざまな生理活性物

質によって神経細胞での発現量が大きく変化することからこれまでの研究の多くが、神経細胞の発現量の変化に注目し行われている。しかしながら BDNF が TrkB 受容体に結合し細胞間情報伝達を行うためには、プロ体タンパク質 (proBDNF) がプロセッシング酵素によって切断され成熟 BDNF (matureBDNF) になること、そして BDNF が蓄積した分泌小胞が開口放出機構 (エキソサイトーシス) によって膜融合し BDNF が細胞外に放出される必要がある。細胞内でプロセッシングを受けずに proBDNF のまま分泌されると TrkB 受容体ではなく細胞死に関連した p75 受容体に高い親和性を持つことが知られており、proBDNF から matureBDNF へのプロセッシングの制御機構を明らかにすることは BDNF を介する細胞間情報伝達において非常に重要な課題となっている。

また、虚血による神経損傷やアルツハイマー病などの神経変性疾患の脳においてアストログリア細胞は、BDNF はじめとするさまざまなペプチドホルモンを開口放出機構によって細胞外に分泌することで神経細胞の生存を保護していると考えられている。そのためアストログリア細胞における BDNF の開口放出制御機構を明らかにすることは神経疾患の治療という面においても非常に重要である。

2. 研究の目的

記憶や学習の分子基盤であるシナプス可塑性を制御することや神経精神疾患の病因に深く関与しているとされる脳神経栄養因子 (BDNF) のアストログリア細胞における細胞内プロセッシング機構およびその開口放出制御機構を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳神経栄養因子 (BDNF) に対するさまざまなモノクローナル抗体の作製 --- BDNF はプロ体 BDNF (proBDNF) として発現し、プロセッシング酵素によって切断され成熟 BDNF (matureBDNF) となる。このプロセッシング過程を研究するためにはそれぞれの BDNF を特異的に認識する抗体が必須となってくる。そこでプロ体部分、matureBDNF の切断末端、matureBDNF についてペプチドを化学合成し KLH (ヘモシアニン) にコンジュゲートした後、マウスに免疫しモノクローナル抗体の作製を行った。

(2) アストログリア細胞からの脳神経栄養因子 (BDNF) 放出の定量解析 --- 培養アストロサイトおよび C6 グリオーマ細胞に BDNF の発現ベクターをリポフェクションまたはエレクトロポレーション法を用いて導入する。次に BDNF を強制発現した細胞の Ca (2+)

を、イオノマイシン (Ca (2+) イオノフォア) などを用いて上昇させる。その後、培地中にアストログリア細胞から放出された BDNF を、ELISA 法を用いて定量する。

(3) グリア細胞からのヒト成長ホルモン (hGH) 放出の定量解析 --- 市販されている BDNF ELISA キットでは感度が悪いため BDNF の放出量は測定できるがさらなる開口放出制御機構の解析には不向きであった。そこで BDNF と同様なペプチドホルモンである hGH を用いてアストログリア細胞におけるペプチドホルモン放出制御機構の解析を行った。培養アストログリア細胞または C6 グリオーマ細胞に hGH の発現ベクターをリポフェクションまたはエレクトロポレーション法を用いて導入する。2, 3 日の培養後、hGH を強制発現した細胞をプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化剤 PMA によって短時間 (10~30 分) 処理をする。次に細胞内の Ca (2+) を、イオノマイシンや ATP などを用いて上昇させる。その際、培地中に放出された hGH を、ELISA 法を用いて定量する。

(4) SNARE タンパク質 SNAP-23 のプロテインキナーゼ C によるリン酸化部位の同定 --- さまざまなペプチドホルモンは分泌小胞に蓄積され、細胞内の Ca (2+) 上昇を受け開口放出によって細胞外に放出される。この開口放出には SNARE タンパク質が必須であること知られている。神経細胞においては VAMP-2, Syntaxin-1, SNAP-25 が主な SNARE タンパク質である。これ対しアストログリア細胞は VAMP-2 および VAMP-3, Syntaxin-4, SNAP-23 が主要な SNARE タンパク質である。

我々は、培養アストログリア細胞および C6 グリオーマ細胞を PMA で処理し PKC を活性化すると SNAP-23 の電気泳動の見かけ上の分子量が大きくなることを見出した (Fig. 1)。この移動は PKC の阻害剤によってなくなることから SNAP-23 が PKC によってリン酸化されることが示唆された。

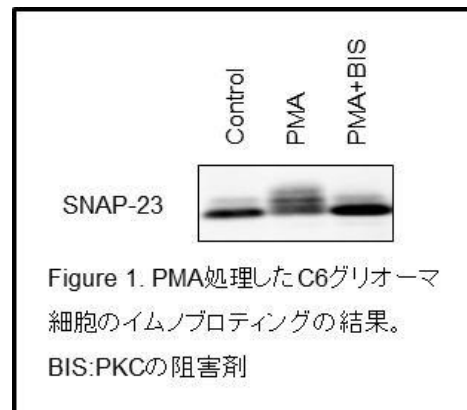
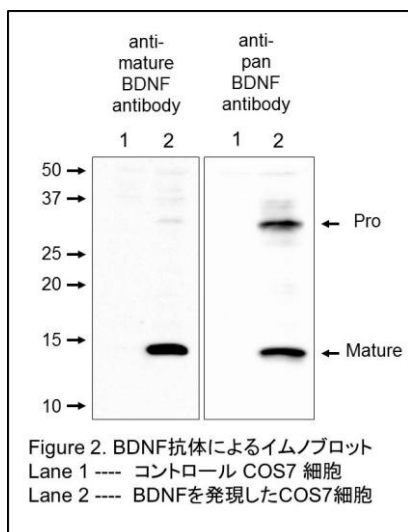


Figure 1. PMA処理したC6グリオーマ細胞のイムノプロテインングの結果。
BIS:PKCの阻害剤

そこで次に SNAP-23 の PKC によるリン酸化部位の同定を行った。C6 グリオーマ細胞を PMA で処理後回収し、界面活性剤 Triton X-100 を用いて可溶化した。超遠心機を用いて可溶化したサンプルを遠心し上清を得た。この上清から抗 SNAP-23 抗体でリン酸化された SNAP-23 を免疫沈降した。さらに免疫沈降した SNAP-23 を SDS-電気泳動法によって分離し、トリプシンで in gel 消化を行った。断片化された SNAP-23 ペプチドを、質量分析器を用いて MS/MS 解析し、リン酸化部位を同定した。さらに同定された SNAP-23 リン酸化部位に対するリン酸化抗体を作製し PMA によってリン酸化量が増えるかをイムノプロットにより確認した。

4. 研究成果

(1) 脳神経栄養因子 (BDNF) に対するさまざまなモノクローナル抗体の作製—プロ体 BDNF (proBDNF), 成熟 BDNF (matureBDNF) の抗体および両方を認識する panBDNF 抗体を作製するためペプチドを化学合成しマウスに免疫した。結果、matureBDNF, panBDNF についてはモノクローナル抗体の作製に成功した (Fig. 2)。



イムノプロットの結果 (Fig. 2) が示すように抗 matureBDNF 抗体は、プロ体 BDNF は認識せず 14kDa 付近の成熟 BDNF を特異的に認識している。それに対して、抗 panBDNF 抗体は、プロ体 BDNF および成熟 BDNF の両方を認識している。現在、プロ体 BDNF のみ を特異的に認識する抗体についても作製中である。

抗 matureBDNF 抗体および抗 proBDNF 抗体を得ることができると細胞染色や組織染色をすることによってプロ体 BDNF および成熟 BDNF がそれぞれどこに局在しているかを区別して検出することができる。

さらに、これらの抗体は BDNF プロセッシング酵素の細胞内における活性化部位やその活性化機構を明らかにするうえで非常に良

いツールになると考えられる。

(2) 培養アストログリア細胞からの脳神経栄養因子 (BDNF) 放出の定量解析 --- ラット培養アストログリア細胞は、我々の培養条件下ではほとんど BDNF を発現していなかった。そこで BDNF の発現ベクターをリポフェクションあるいはエレクトロポレーション法を用いて培養アストログリア細胞に導入した。2, 3 日培養した後、培地を低カリウムバッファー (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 11 mM glucose, 15 mM HEPES-NaOH, pH 7.4) で数回置換した。最後の置換の後、低カリウムバッファーを 2 分後に回収し、次にイオノマイシンを添加した低カリウムバッファーに置き換え 2 分後に回収する操作を繰り返した。その回収した溶液中の BDNF 量をプロメガ社の BDNF ELISA キットによって定量した。その結果、イオノマイシン刺激をすることで BDNF が放出されてくることがわかった (Fig. 3)。また C6 グリオーマ細胞においても同様に BDNF が開口放出によって分泌されることを確認している。

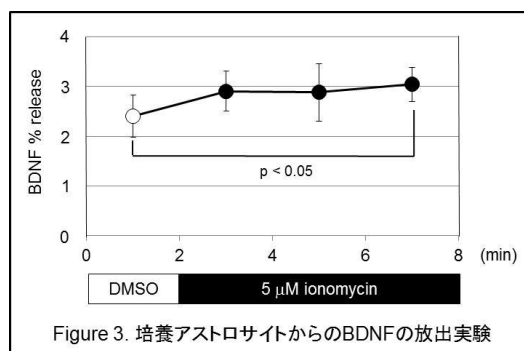


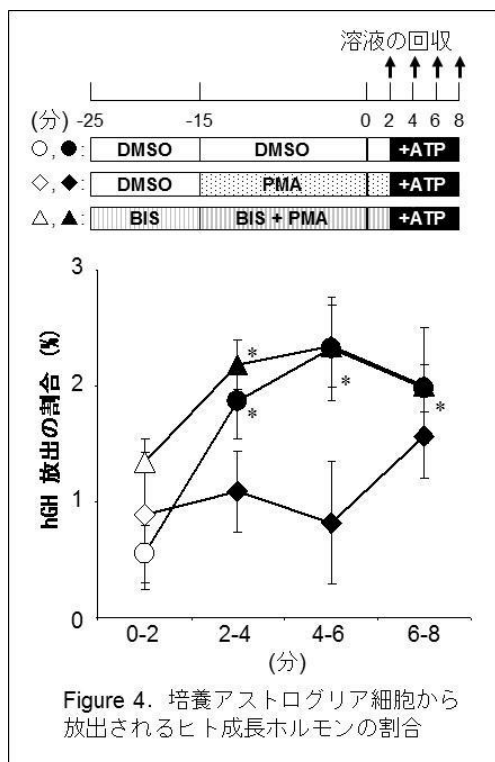
Figure 3. 培養アストロサイトからの BDNF の放出実験

しかしながら BDNF の発現量が不十分であることや ELISA キットの問題から、培養アストログリア細胞の開口放出制御機構の詳細な解析には BDNF は不向きであると考えられたため以降の解析にはヒト成長ホルモンを用いた。

BDNF に関しては現在、発現量を増やす試みや作製した抗体を用いた ELISA 法の検討などを行っている。

(3) 培養アストログリア細胞からのヒト成長ホルモン (hGH) 放出の定量解析 --- これまでに神経細胞や分泌細胞の開口放出はさまざまなプロテinkinナーゼによって制御されていることが報告されている。当研究室においてもプロテinkinナーゼ C (PKC) の活性化剤 PMA の処理により神経モデル PC12 細胞からの開口放出が促進することを報告している。そこで培養アストロサイトの開口放出も PKC によって制御されているかを検討することにした。

BDNF と同様に hGH の発現ベクターをリポフェクションあるいは電ポレーション法を用いて培養アストロサイトを導入した。2, 3 日の培養後、Fig. 4 にあるタイム

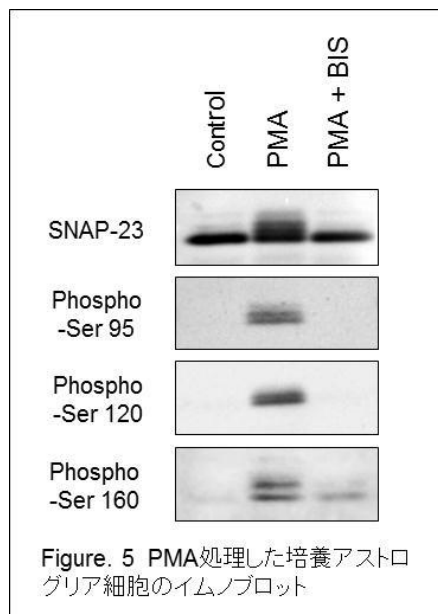


テーブルにしたがって、アストログリア細胞を PKC の阻害剤 BIS および PKC の活性化剤 PMA で前処理し、ATP によって細胞内 Ca²⁺ が上昇した際に放出されてくる hGH を、ELISA 法を用いて定量した。その結果、非常に興味深いことに PMA は神経モデル PC12 細胞では開口放出を促進したのに対し、培養アストログリア細胞では抑制することが明らかとなった。またこのアストログリア細胞からの開口放出の抑制は、PKC の阻害剤 BIS によってキャンセルされることからこの抑制に PKC が関与していることが示唆された。

現在、PKC だけでなく他のリン酸化酵素が培養アストログリア細胞からの開口放出をどのように制御しているかを検討している。

(4) SNARE タンパク質 SNAP-23 のプロテインキナーゼ C によるリン酸化部位の同定—PMA 処理した C6 グリオーマ細胞の可溶性分画を用いて SNAP-23 を免疫沈降した。つぎに回収した SNAP-23 を SDS-電気泳動法によって分離し、トリプシンで in gel 消化を行った。断片化された SNAP-23 ペプチドを、質量分析器を用いて MS/MS 解析したところ、24 番目の Thr 残基、95, 120, 160 番目の Ser 残基が PMA 処理によってリン酸化される可能性があることがわかった。

そこでそれぞれの部位に対するリン酸化ペプチドを作製し、ウサギに免疫を行い、抗血清を得た。得られた抗血清からリン酸化ペプチドを結合したカラムで抗体を精製後、非リン酸化ペプチドで吸収することで、リン酸化部位特異的抗体を作製した。Fig. 5 に示すように、95, 120, 160 番目の Ser 残基は PMA 処理によって PKC の活性化に依存してリン酸化が亢進していることが確認できた。24 番目の Thr 残基のリン酸化抗体は現在作成中である。今後これらの抗体を用いて組織化学を行うことでこれらのリン酸化の意義を明らかにしていく予定である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Yasuda, K., Itakura, M., Aoyagi, K., Sugaya, T., Nagata, E., Ihara, H., Takahashi, M. PKC-dependent inhibition of Ca²⁺-dependent exocytosis from astrocytes. *Glia*. 59, 143-151. (2011) 査読 有

[学会発表] (計 2 件)

① Yasuda, K., Itakura, M., Aoyagi, K., Sugaya, T., Yamamori, S., Takahashi, M. Phorbol 12-myristate 13-acetate suppresses Ca²⁺-dependent exocytotic release from rat astroglial cells. 第 36 回 国際生理学会世界大会 2009/7/28 (京都)

② Yasuda, K., Itakura, M., Nagata, E., Yamamori, S., Ihara, H., Takahashi, M. Identification of PKC-dependent

phosphorylation sites of SNAP-23 in clonal
glia cells. 第52回 日本神経化学会大会,
2009/6/23 (伊香保)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板倉 誠 (ITAKURA MAKOTO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30398581